苹毛丽金龟痘病毒的显微镜研究

丁 翠 蔡秀玉
(中国科学院动物研究所)

摘要 使用显微镜技术对苹毛丽金龟 (*Proagopertha lucidula Falderman*) 幼虫痘病毒进行研究。寄主受感染的部位是脂肪体细胞和血细胞的细胞质。病毒包涵体有三种形状: 纺锤体、球状体、椭球体，大小分别为 3.69×6.30μ, 8.10μ, 7.78×9.84μ。前者中无病毒粒子存在，后二者含病毒粒子。在被感染的脂肪体细胞内，病毒粒子成熟一般需要经过六个阶段: 1) 在病毒基质周缘形成部分弧形囊膜; 2) 囊膜完全形成; 3) 在囊膜内产生内核物质; 4) 内核物质分化; 5) 内核外膜出现; 6) 单个侧体产生，病毒粒子由圆形被压抑成长圆形，最后被包埋进入球状体或椭球体的蛋白质晶格内。在包涵体内的成熟病毒粒子的大小为 250×500 nm，由下列几部分组成: 1) 电子高度致密的内核; 2) 内核中的绳索物质，直径为 20 nm，叠成 4—5 折，按病毒粒子的长轴方向排列; 3) 内核的外膜，分为三层; 4) 单侧体，位于内核的凹窝处; 5)囊膜和囊膜外面的球状亚单位，其直径为 12nm。这些球状亚单位使病毒粒子似桑葚外形。

关键词 苹毛丽金龟 昆虫痘病毒

苹毛丽金龟 *Proagopertha lucidula* 是北方果树的重要害虫之一，成虫取食花蕾，造成果树的减产。1982年秋在北京郊区县采集金龟子幼虫时发现了苹毛丽金龟幼虫的病原性痘病毒，被感染的幼虫呈明显的白垩色，经饲养后白垩色加重，活动性减弱。光学显微镜检查在血淋巴中看到折光性极强的大小不等的纺锤形晶体、球状体和椭球体。电镜观察可见到球状体内的病毒粒子。

自 Vago (1963) 第一次报道了西方五月鳃金龟幼虫 *Melolontha melolontha* 的痘病毒后，陆续在鞘翅目 (Vago 等, 1968)、鳞翅目 (Weiser 等, 1966; Sutter, 1972)、直翅目和双翅目昆虫上又发现不少此类病毒，直至1980年止已达48种 (Martignoni 等, 1981)，并对其中24个种进行形态学、病理学、毒性和生化特性等方面的研究 (Federici 等, 1974; Henry 等, 1969; Granados 等, 1970)。按1982年国际病毒分类委员会无脊椎动物病毒小组委员会的建议把昆虫痘病毒定为痘病毒科(Poxviridae)的一个亚科 (Entomopoxvirinae) 又根据病毒形态、寄主和染色体的分子重量等特点，分此亚科为三个属: 即A属 (鞘翅目昆虫的痘病毒); B属(鳞翅目和直翅目昆虫的痘病毒); C属(双翅目昆虫的痘病毒)(Matthews, 1982)。

我国对昆虫痘病毒的发现和研究都较晚，最早报道的是1981年新疆西伯利亚蝗 *Gamphocerus sibiricus* Linne 痘病毒，无纺锤体存在 (黄传贤, 1981)。其次是1982年发现的粘虫 *Leucania separata* Walker 痘病毒(曾凡济等, 1982)，但含有纺锤体。我们在本文描述的为A属病毒，对于此属病毒，国外除西方五月鳃金龟以外，研究较多的还有 *Fignlis eubevis* (Vago 等, 1968); *Othnonius batesi* (Goodwin 等, 1969), *Anomala cuprea* (片桐一正

本文于1983年8月收到。
承蒙本组杨明华同志采集病虫标本，特此感谢。

等，1975）。但在我国还属首次报道，因此我们对此种病毒进行了形态特征、病症和组织病理等方面的研究，现将结果报道如下。

材 料 和 方 法

材料　野外采集的罹病幼虫，置于 27 ± 1℃ 培养箱内饲养，观察病症变化。

方法：1）光学显微镜观察　水封片或用什维佐娃法染色后观察。

2）扫描电镜观察　病毒样品经差速离心方法初步提纯后，用蒸馏水稀释成一定的浓度，滴于铜片或盖玻片上，喷金，H-300 型电子显微镜观察。

3）超薄切片和透射电镜观察　从濒死幼虫体内取出脂肪体后，切成 1 mm^3 的小块，立即用 4% 戊二醛和 1% 锇酸分别固定 1 小时，缓冲液洗涤 3 次，30%—100% 梯度酒精或丙酮脱水，Epon 812 包埋，KLB 48002A 切片机切片。切片用醋酸铀和柠檬酸铅双染，以 H-300，JEM-100CX 电子显微镜观察。

结 果 和 讨 论

一、病症

罹病幼虫濒死前活动性减弱，表皮失去光泽，体色由正常透明白色变为白垩色，脂肪体肿胀呈乳糜状。健康幼虫的尾部背面透明，可见上皮层下面黑色的后肠袋，而病虫由于脂肪体的病变，此部分表现为白浊。本疾病历程较长，有时可达 2—3 月之久，还有长达 8 个月的例子（Goodwin，1975）。

二、光学显微镜观察

染病幼虫的血淋巴是乳白色的，经水稀释，在相差镜下见到大量游离的纺锤体和球状体（图版 I：1）。同样，在脂肪体的压片中亦可看到较多游离的折光性极强的纺锤体和球状体。纺锤体的大小差异明显，形状也不完全一致，球状体大而折光性强，数量比纺锤体少。有时发现纺锤体和球状体被一层薄膜包裹形成一个囊胞的情况（图版 I：2）。病毒水悬液自然干燥后，用 1% NaOH 处理 1 分钟，伊红染色，纺锤体和球状体均被染成深红色，如不用 NaOH 预处理，则球状体不着色，而纺锤体仍被染成红色，从染色反应看，二种包涵体蛋白质的性质似有区别。

三、扫描电镜观察

在扫描电镜下，痘病毒的包涵体有三种形式：纺锤体，球状体和椭球体（图版 I：3）。纺锤体的大小差异显著，小至 0.714μ 大至 15.3μ，平均约为 $3.69 \times 6.30\mu$，有时比球状体大，而且形状各有不同，大部分为长纺锤形，纵轴与横轴的比为 2:1，少数近菱形，纵轴与横轴之比为 1。除正常单个纺锤体外，尚发现畸形的嵌合体（图版 I：4），似是由二个单个纺锤体垂直镶嵌而成。球状体基本上为球状，比较大（图版 I：5），椭球体为长椭圆形，一般比球状体更大（图版 I:6），这二种包涵体的表面较粗糙，有阶梯般的层次。此外，还常发现一种球状体或椭球体，没有完整的外表面，而是均匀分布着许多直径相似的凹窝（图版 I：7），据分析此类包涵体属球状体或椭球体的不成熟的形式，也就是还未形成其最外面的蛋白质层，表面的这些病毒粒子，在制片过程中极易脱落，故留下许多直径相似的凹窝。此种现象与核、质型多角体中的情况极其类似（蔡秀玉等，1982）。一般这类包涵体均比发育

完全的小。Bergoin (1976) 在 *M. melolontha* 痘病毒的扫描电镜中也看到过这种带凹窝的包涵体,但他认为这是球状体或椭球体的另一种形态。

四、痘病毒在脂肪体细胞内的形态发生和病毒粒子的结构

1.病毒粒子的成熟和包涵体的形成　在被感染的脂肪体细胞内可以看到许多纺锤形和球形的包涵体,前者无病毒粒子,后者包含许多长椭圆形和圆形外廓的粒子,呈放射状排列(图版 II: 8)。Smith (1976) 认为痘病毒包涵体内的病毒粒子的排列是定向的而不象杆状病毒那样是任意的。一般被包入球状体内的病毒粒子都应是成熟粒子,其纵切面为长椭圆形,横切面为圆形(图版 II: 9)。不成熟的病毒粒子在未完成其成熟周期前均不被包入,所以在球状体的周围可看到许多不成熟而处于各种阶段的病毒粒子,它们与成熟病毒粒子不同的是为球形。从图版 II、III 中看出,病毒粒子由非成熟形式变为成熟形式可能有二种途径,一是在电子致密的、轮廓不清的物质(病毒发生基质类型 I, 简称 VSI)附近形成弧形的囊膜(图版 II: 10_a)。膜合拢成球形,同时把电子致密物质包在其内,成为一个实心的球状颗粒(图版 II: 10_{a-1})。另一途径是病毒基质可能为一些电子非致密的絮状物(病毒发生基质类型 II, 简称 VSII)(图版 II: 10_b),在其周围也形成球形的囊膜。囊膜明显地分为三层,二层致密物质之间夹一层无染色的透明带(图版 II: 10_c),膜内包有许多絮状物质,它们以后形成电子致密物质(图版 II: 10_{b-2}),这种物质充满整个膜而形成一个实心的球状颗粒。无论那种病毒发生基质形成的球状颗粒,其内部电子致密物质似乎都由二种成分组成,细颗粒而略浅的称为 x 物质,粗颗粒深色的称为 y 物质(图版 III: 12)。Goodwin (1969) 推测这二种不同的物质可能分化成不同的结构, y 物质分化成内核, x 物质分化成内核以外的结构,一般 y 物质分布在膜内偏中心的地方。这些带有完整囊膜的球状病毒粒子的直径为 430nm。病毒粒子的成熟过程大致可分为下面六个阶段: a,在病毒发生基质周缘形成不完全的弧形囊膜; b,囊膜完全形成; c,囊膜内电子致密物质的出现; d,电子致密物质分化和内核的形成; e,内核外膜出现; f,病毒粒子由圆形被压抑成长圆形。这种半成熟的病毒粒子已初具成熟病毒粒子的形态,有一偏离中心的内核、内核外面的膜和内核外的蛋白部分,但是囊膜的亚单位结构仍不明显,内核中的纤维物质也未分化。Goodwin (1969) 曾提到在 *Othnonius batesi* 中,痘病毒粒子的继续分化可以发生在被球状体包埋的过程中,其间病毒粒子由圆变长,囊膜的分化,内核纤维物质的成熟等。在 *P. lucidula* 中也发现此种现象,主要表现在成熟病毒粒子游离于细胞内的极少,仅有半成熟的病毒粒子存在,这种半成熟的病毒粒子可能在球状体的包埋过程中继续分化成熟。此外,在一些球状体内还发现边缘的或近边缘的病毒粒子与远离边缘不一样,前者病毒粒子为半成熟类型,内核和囊膜均无分化,而后者系成熟粒子,囊膜的波状纹明显,内核的纤维物质已成绳索状(图版 III: 11)。我们认为这种在包埋过程中逐渐成熟的方法是痘病毒形态发生的一个特征,这是与其它包涵体病毒显著不同的地方。

2.纺锤体的形成　伴随着球状体存在的纺锤体,其内部无病毒粒子,是一个只有蛋白质晶体结构的物质,(Bergoin 等, 1970) 认为它的蛋白质性质从血清和化学性质上都与球状体不同。双翅目和直翅目昆虫在痘病毒的感染过程中不产生纺锤体,纺锤体对寄主的作用和其产生的原因仍未查明,也可能是一种与寄主有关的现象。在 *P. lucidula* 脂肪体

细胞的细胞质内可见到许多形状不同的纺锤体，有的比球状体还大，在纺锤体的最外面裹有一层极薄的膜。Devauchelle 等(1971) 认为此膜可能是内质网膜（图版 III: 13)，同时在图版 III: 14 中还可见到聚集的小纺锤体外面也围有一层电子致密的薄膜。因为 Devauchelle 等(1971) 曾发现在被痘病毒感染的细胞内质网膜内有类似纺锤体的蛋白存在，由此推测纺锤体是否在内质网膜和一些特殊的囊泡内形成和发育。

3. 脂肪细胞内结构的病变　在被感染的细胞内，特别是在病毒粒子大量形成的部位，可以看到线粒体结构的变化，其形状变圆，膜部分破裂，嵴消失，有的几乎成为一个又圆又大的透明球体(图版 III: 15)。此外，在细胞质内经常出现一种管状的单膜结构，其形态与微管有些类似，但由于它的量较大并且在球状体和纺锤体存在的部分特别多，推论可能与球状体，纺锤体的形成有关(图版 III: 16. fht)。在 *M. melolontha* 中，Devauchelle 等(1971) 也发现了这种结构，称之为螺旋管束结构 (fascicle of helicoidal tabular structure)。脂肪体细胞的核亦有病变(图版 III: 16)，核内染色质断为片段，并向核膜周缘集中，核内还出现无定型的电子致密物质和纤维，由于细胞质内较大纺锤体的形成，有时把细胞核挤向一边。

4. 成熟病毒粒子的微细结构　痘病毒成熟粒子的形态结构是昆虫病毒中最复杂的一种，有些微细结构的作用还不清楚 (Bergoin 等，1971)。成熟病毒粒子的纵长为 500 nm，横切面的直径为 250nm。病毒粒子的内核是电子致密的，从纵轴方向看为肾形，一侧有一个凹窝，内核外面围绕着 15nm 厚的膜，膜分为三层，中间层较薄，外层较厚。在内核中间则可见到电子非致密的绳索状结构，绳索的直径为 20nm，横切面上只能看到 5—6 个同样大小的圆点(图版 III: 17)，纵切面为折叠成几折的长条 (图版 III: 18)。一种中等致密物质围于内核膜外，并在内核凹入的腔内形成单个侧体 (图版 III: 19)，最外层为染色浅的薄囊膜，囊膜厚度为 5nm，囊膜外面有球状亚单位构成的表层，球状亚单位的直径是 12nm，由于球状亚单位的存在，在切面上使痘病毒粒子呈现波纹状的边缘 (图版 III: 17)。而使用负染技术，可使整个病毒粒子显示出桑葚状的表面结构。图版 III: 18、19、20 分别为该虫痘病毒粒子的纵切、正切和横切面。

苹毛丽金龟是较重要的果树害虫，使用微生物方法对其进行防治是当前解决农药公害的有效措施。利用昆虫痘病毒防治害虫的例子还为数不多，加拿大在 70 年代曾用痘病毒防治云杉卷叶蛾 *Choristoneura fumiferana* 收效尚好，在我国还没有先例，所以应用痘病毒防治苹毛丽金龟的危害还需作许多基础研究工作。

参　考　文　献

黄传贤　1981　西伯利亚蝗的一种昆虫痘病毒。植物保护 7(5): 12。

曾凡济、刘年翠　1982　粘虫痘病毒的分离及鉴定。自然杂志 5(6): 475—7。

蔡秀玉、丁　翠　1982　在我国发现的一些昆虫病毒。昆虫学报 25(4): 413—5。

片桐一正等　1975　ドゥガネブイブイの昆虫ポックスウイルス病。日本应用动物昆虫学会志 19(4): 243—252。

Bergoin, M. et al., 1976 Les inclúsions fusiformes associées à I'entomopoxvirus du Coleoptére *Melolontha melolontha*. *J. Ultrastructure Research* **15**(1—2): 17—30.

Bergoin, M. et al., 1971 Electron microscopy study of *Melontha* poxvirus: The fine structure of occluded virions. *Virology* **43**(2): 453—67.

Bergoin, M. and Veyrunes, J. C., 1970 Isolation and amino acid composition of the inclusions of *Melolontha melolontha* poxvirus *virology* **40**(3): 760—2.

Devauchelle, G. et al., 1971 Etude ultrastructurale du cycle de replication d'un entomopoxvirus dans les hèmocytes de son höte. *J. Ultrastructure Research* **33**(3—4): 301—21.

Federici, B. A. et al., 1974 An entomopoxvirus and a nonoccluded viruslike particle from larvae of the chironomid, *Goeldichironomus holoprasinus*. *J. Invert. Pathol.* **23**(1): 117—20.

Granados, R. R. and Roberts, D. W., 1970 Electron microscopy of a poxlike virus infecting on invertebrate host. *Virology* **40**(1): 234—43.

Goodwin, R. H. and Filshie, B. K., 1969 Morphology and development of an occluded virus from the black soil scarab, *Othnonius batesi*. *J. Invert. Pathol.* **13**(3): 317—29.

Goodwin, R. H., 1975 Diagnosis and infectivity of entomopoxviruses form three Australian scarab beetle larvae (Coleoptera: Scarabaeidae). *J. Invert. Pathol* **25**(1): 47—57

Henry, J. E. et al., 1969 Pathology and development of the grasshopper inclusion body virus in *Melanoplus sanguinipes*. *J. Virol.* **3**(3): 605—10.

Matthews, R. E. F., 1982 Classification and nomenclature of viruses. *intervirology* **17**(1—3): 1—200.

Martignoni, M. E. and Iwai, P. J., 1981 A catalogue of viral diseases of insects, mites and ticks. In: "Microbial control of pests and plant diseases'' 1970—1980, (Edited by H. D. Burges), p. 897—911.

Sutter, G. R., 1972 A poxvirus of the army cutwom. *J. Invert. Pathol.* **19**(3): 375--82.

Smith, K. M., 1976 Routes of infection and replication of insect viruses. In: "Virus-insect relationships" (Edited by K. M. Smith), p. 156—9.

Vago, C., 1963 A new type of insect virus. *J. Insect. Pathol.* **5**(2): 275—6.

Vago, C. et al., 1968 Virose a fuseaux d'un Scarabeide d'Amerique du Sud. *Entomophaga* **13**: 373—6.

Vago, C. et al., 1968 Nouvelle virose a fuseaux observee chez un Lucanide (Coleoptera) de Madagascar. *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris,* **266**: 1621—3.

Weiser, J. and C. Vago, 1966 A newly described virus of the winter moth, *Perophtera brumata* HBUNER (Lepidoptera, Geometridae). *J. Invert. Pathol.* **8**(3): 314—9.

A MICROSCOPIC STUDY OF *PROAGOPERTHA LUCIDULA* POXVIRUS

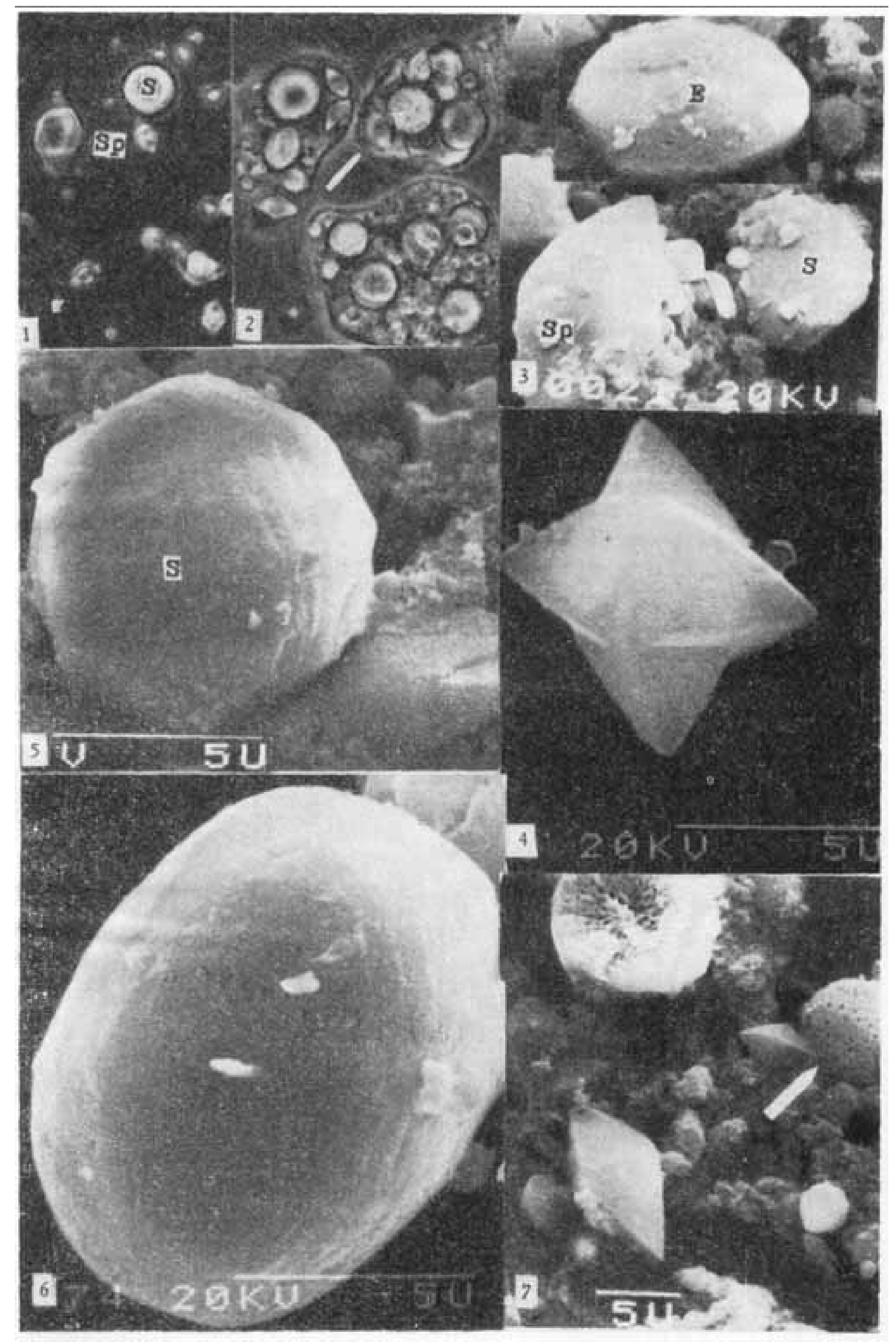
DING TSUEY　TSIA SIU-YU
(Institute of Zoology, Academia Sinica)

The *Proagopertha lucidula* poxvirus multiplies mainly in the fat body and hemocytes of the grub. Electron microscopical studies have been made on the thin section of the infected fat body of the diseased larvae. Three types of inclusion (spheroid, ellipsoid and spindle) have been found in the cytoplasm. The spheroid, 8.10 μ in size, contains numerous virions. The spindle, 3.69×6.3 μ in size, is a crystalline structure and devoid of particles.

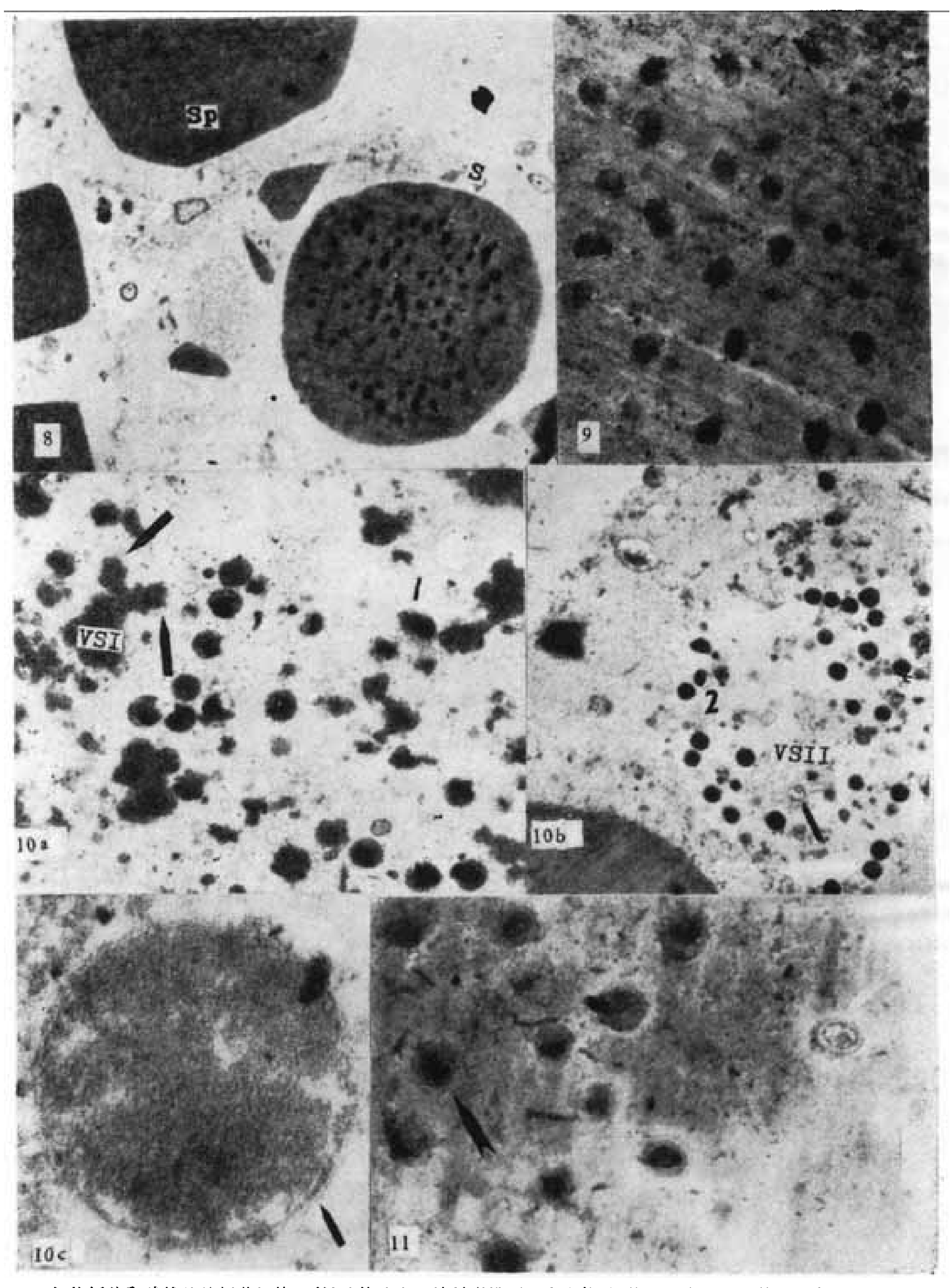
The maturation of the virus particle takes place through the following six stages: 1. The envelope membrane takes shape at the periphery of the viroplasm in the form of arched segments. 2. A complete envelope membrane is formed. 3. The core substance appears within the envelope membrane. 4. The core bacomes more differentiated. 5. The core is surrounded by a layer of less electron dense substance. 6. The particle becomes laterily compressed and singular lateral bodies appear.

The mature virions are oval and 250×500 nm in size. The surface of the virus envelope consisted of spherical units 22 nm in diameter arranged not in apparent symmetry, giving the virion an outline of a mulberry. Each virion possesses an eccentric unilaterally concave core containing an electron dense substance and delimited by a three-layered coat 15 nm wide. Inside the core a folded ropelike component, electron lucent and 20 nm in diameter, lies parallel to the long axis of the particle. Between the core coat and the virus envelope a lateral body is formed by substance of intermediate electron density.

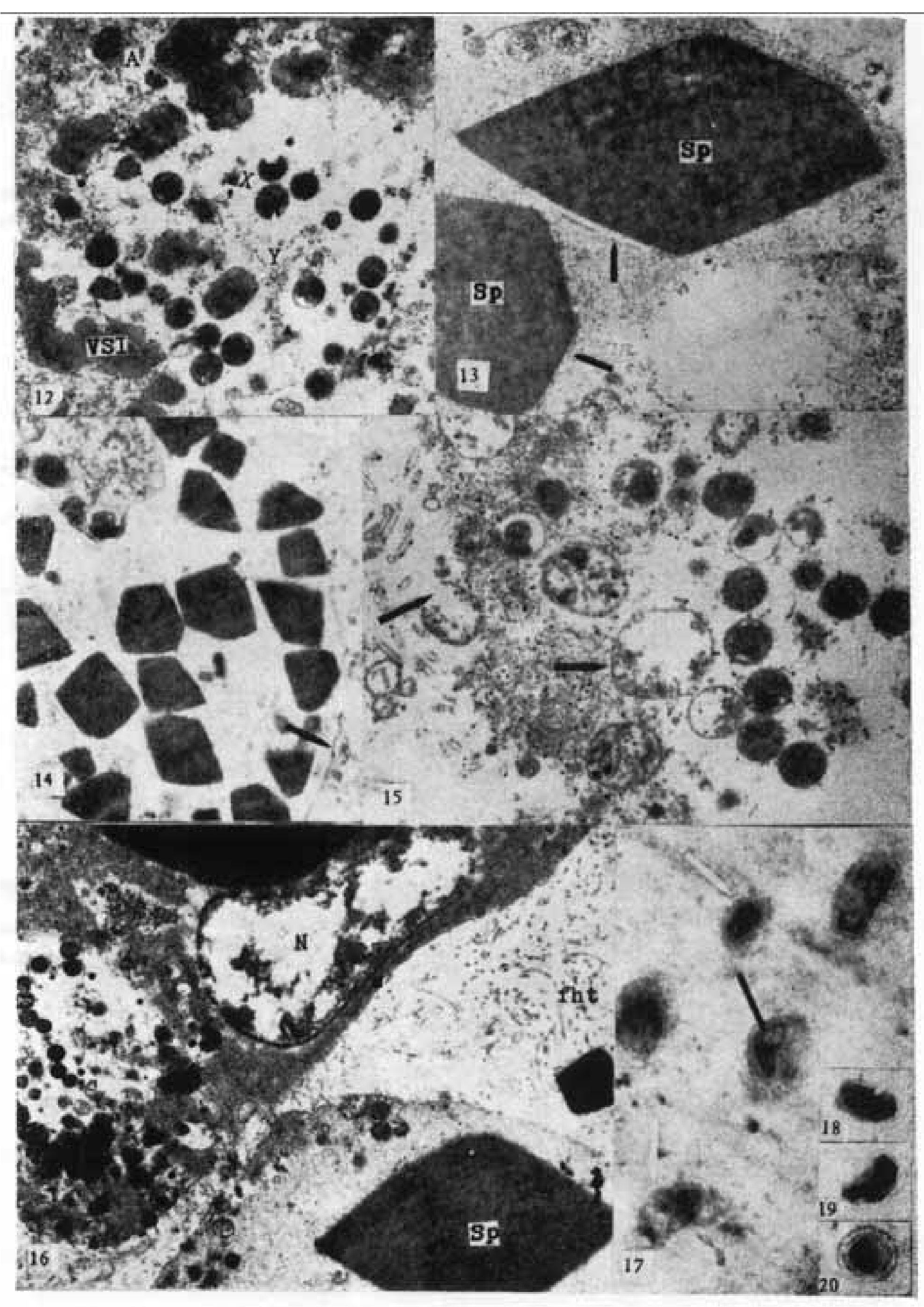
Key words　*Proagopertha lucidula*——poxvirus



1.感染痘病毒的苹毛丽金龟幼虫的血淋巴涂片，示球状体（S）和纺锤体（Sp）.（相差显微镜 540×）。 2.感染痘病毒的苹毛丽金龟幼虫的脂肪体压片，示围在球状体和纺锤体外面的膜(箭头)。相差显微镜 540×。 3.痘病毒包涵体的三种类型，球状体（S），椭球体（E），纺锤体（Sp）. 4.二个垂直相嵌的畸形纺锤体。5.球状体的表面带有层次。 6.表面有层次的椭球体。 7.表面带有许多凹窝的球状体（箭头），凹窝可能是病毒粒子脱落后留下的。



8.纺锤体和球状体的超薄切片，可见球状体内呈放射形排列的病毒粒子，纺锤体内无病毒粒子，5，940×。9.球状体的超薄切片，可看到蛋白晶格内的病毒粒子的形态，20,700×。10a 病毒发生基质类型 I（VSI）外面形成的不完全的膜（箭头），18,000×。10a-1 膜包裹着病毒发生基质形成一个实心的球体。10b 病毒发生基质类型 II（VSII）和形成的球体（箭头）9，000×　10b-2 膜内絮状物质发育成电子致密的内核物质. 10c 不成熟病毒粒子外面的膜（箭头）分为三层。72,000×　11.一个正在包埋的包涵体，可见其边缘的病毒粒子（白箭头）与深处的病毒粒子（黑箭头）形态上不同，前者的内核中的索状物质尚未分化。36,000×



12.不成熟的球状颗粒内含有二种物质，浅色的 x 物质和深色的 y 物质。10,560× 13.大纺锤体外面的薄膜(箭头)8,000× 14.聚集在一堆的小纺锤体外面，也可见薄膜(箭头)13,280× 15.感染后的脂肪体细胞中，线粒体的变化(箭头)，16,800× 16.脂肪体细胞核的病变和螺旋管束结构（fht）的产生，6,000× 17.内核中绳索物质的横切面及囊膜表面球状亚单位的切面(白箭头) 40,000×。 18.内核中绳索物质的纵切面 35,200×。19.病毒粒子的平切面 35,200×。20.病毒粒子的横切面 35,200×。